

新規アクチン結合タンパク質（p57）の構造と機能 ：免疫系細胞特異的細胞内情報伝達分子

著者	豊島 聡
雑誌名	星薬科大学紀要
号	37
ページ	1-9
発行年	1995
URL	http://id.nii.ac.jp/1240/00000089/

新規アクチン結合タンパク質 (p57) の構造と機能 —免疫系細胞特異的細胞内情報伝達分子

豊 島 聡

星薬科大学 生化学教室

Structure and Function of a Novel Actin-Binding Protein, p57 —an Immune Cells-Specific Intracellular Signal Transduction Molecule

Satoshi TOYOSHIMA

Department of Biochemistry, Hoshi University

1. はじめに

免疫系の細胞は、異物（抗原）と出会うと活性化され、ある場合には増殖して数を増やして、異物の侵入した場所に集まり、異物を排除するために機能を発揮する。すなわち、免疫系の細胞が機能を発現するためには、活性化されることに加え、機能を発現すべき場所に移動する必要がある。Fig. 1 に血中の白血球がどのようにして、細菌などが感染した部位へ移動するかを示した¹⁾。血中の白血球はかなりのスピードで動いているが、細菌感染部位に近い血管内皮細胞と接触すると白血球の移動スピードは極端に低下して血管表面をころがる状態（ローリング）となる。これは細菌感染部位からのサイトカインが血管内皮細胞に作用して E-セレクトインと呼ばれる細胞接着分子を発現させ、白血球が E-セレクトインと相互作用するためにおこる。ローリング状態にある白血球に白血球走化因子が作用すると白血球は活性化されて、血管内皮に強く接着するとともに血管外へと移動を始める。血管外へ出た白血球は、白血球走化性因子の濃度勾配を逆のぼって細菌感染部位へ到達し、貪食などにより、細菌を処理する。走化性因子が白血球を活性化し、移動のためのシグ

ナルを与えるわけであるが、この活性化・細胞の動きを誘発するための情報の細胞内への伝達については多くの研究室で研究されてきた。走化性因子が、その受容体に結合すると、受容体とリンクした GTP 結合蛋白質（G 蛋白）が活性化される。活性化 G 蛋白は、イノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼ C (β タイプ) を活性化し、このホスホリパーゼ C がホスファチジルイノシトール 4,5 二リン酸を分解して、セカンドメッセンジャーであるイノシトール 1,4,5 三リン酸 (IP_3) と 1,2-ジアシルグリセロール (DG) を産生する。 IP_3 は細胞内 Ca^{2+} 貯溜からの Ca^{2+} の遊離を促し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、 Ca^{2+} 依存性の蛋白質リン酸化酵素の活性化などにつながる。一方 DG はプロテインキナーゼ C の活性化につながり、未だ不明な基質蛋白質がリン酸化される。このあとの情報伝達についてはあまり明確になっていないが、最終的に細胞の動きは、細胞骨格系の主要成分であるアクチン繊維とアクチンの機能制御作用を有するアクチン結合蛋白質によりコントロールされていると考えられる。既に種々のアクチン結合蛋白質が報告されている²⁾が、各々特異的機能と結びついており、動物細胞では、走化性の制御に関わるアクチン結合蛋

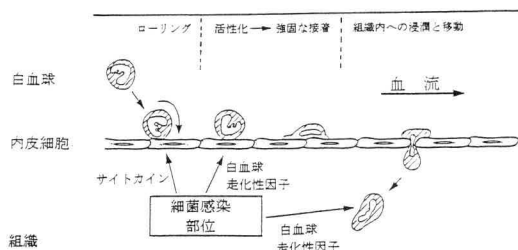


Fig. 1. 白血球の細菌感染部位への移動

白質は報告されていない。

我々は白血球走化性の情報伝達に含まれるホスホリパーゼCについて研究を進め、 β タイプ以外のホスホリパーゼCが関与している可能性を見出し、その精製を試みたところ、新種のアクチン結合蛋白質を発見した。このアクチン結合蛋白質の遺伝子をクローニングし、その構造的特徴等を調べた結果、本蛋白質が白血球の走化性制御に関わる可能性が示された³⁾。

2. 新規アクチン結合蛋白質 (p57) の精製と部分アミノ酸配列

ウシの胸腺から β タイプと異なるホスホリパーゼCの精製を進め、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で一本のバンドを示す画分を得た (Fig. 2)。このバンドの位置から、本蛋白質の分子量は約5万7千と計算されたので、p57と命名した。p57は、精製最終ステップでホスホリパーゼCとしての比活性が低下していた。このことはp57がホスホリパーゼCではなく微量混入していたホスホリパーゼCが活性を示したか、精製の最終段階で部分的に失活したかであることを示唆する。この点を明らかにするために、p57をリジルエンドペプターゼで分解し、HPLCの逆相カラムにより分解ペプチドを分離した後、各ペプチドのアミノ酸配列の決定を行った。3種のペプチドのアミノ酸配列を決定して、既知の蛋白質のアミノ酸配列と比較したところ、そのうちの1種 (CEIARFYK) が、粘菌の定化性、増殖に関わるコロニンと呼ばれるアクチン結合蛋白質中に存在す

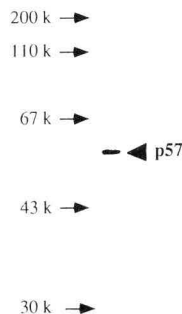


Fig. 2. Silver staining of p57 purified from Superose 12 column chromatography on SDS-PAGE. Molecular weight markers are indicated in lane 1. Purified p57 is pointed by arrow head in lane 2.



Fig. 3. ウシ p57 の部分アミノ酸配列と粘菌コロニンのアミノ酸配列

るアミノ酸配列 (CEIARGLK) と高い相同性を有することが判明した⁴⁾ (Fig. 3)。残る2種のペプチドについてもコロニン中に類似のアミノ酸配列が存在するかどうかを調べたところ、相同性のあるアミノ酸配列が存在していた (Fig. 3)。このことは、p57が、動物細胞における、粘菌のコロニンに相当する蛋白質であることを示唆する。コロニンは、粘菌の細胞運動、特に走化性に関わるアクチン結合蛋白質であることが判明している⁵⁾。従って、p57は動物細胞の走化性の制御に関わるアクチン結合蛋白質である可能性が示された。

3. p57 の遺伝子のクローニングと一次構造

p57は、動物細胞における新種のアクチン結合蛋白質であることが、その部分アミノ酸配列から推定された。このことを確認するとともにその生理的役割を推測するために、p57の遺伝子をク

human p57
calif p57

1 73
2 68

148
141

a. a. p57 (calif)

223
216

373
366

448
441

523
516

598
591

673
666

748
741

823
816

898
891

973
966

1048
1041

1123
1116

1198
1191

1273
1266

1348
1341

1423
1416

1498
1489

1570
1560

1645
1575

1657
1575

Fig. 4. Nucleotide sequences of calf and human p57 and a deduced amino acid sequence of calf p57. The underlines indicate a polyadenylation signal sequence (AATAAA). The bold underlines indicate the lysyl-C peptides (details in section 2) derived from calf p57.

hp57	MSRQVRSKFRHVFQPAKADQCYEDVRVSQTTWDSGFCVNPKEVALI	50
cp57	MSRQVRSKFRHVFQPAKADQCYEDVRVSQTTWDSGFCVNPKEVALI	50
coronin	MSK-VVRSKFRHVFQPAKADQCYEDVRVSQTTWDSGFCVNPKEVALI	49
	CEASGGGAFLVPLGKTRGVKNAPTVCCHTAPVLDIAWCPHNDNVIASG	100
	CEASGGGAFLVPLGKTRGVKNAPTVCCHTAPVLDIAWCPHNDNVIASG	100
	WDAAGGGSFAVIPHEASGK-TTSVPLFNHGKSAVLDTAFHPFENLVGSV	98
	1	
	SEDCTVMVMEIPDGGMLPLREPVVLTGHTKRVGIVAHHTAQNVLLSA	150
	SEDCTVMVMEIPDGGMLPLREPVVLTGHTKRVGIVAHHTAQNVLLSA	150
	SEDCTVMVMEIPDGGMLPLREPVVLTGHTKRVGIVAHHTAQNVLLSA	148
	2	
	GCDNVIMVWDVGTGAAMLTLGPEVHPDTIYSVDWSRDGLICTSCRDKRV	200
	GCDNVIMVWDVGTGAAMLTLGPEVHPDTIYSVDWSRDGLICTSCRDKRV	200
	SGDFLVKTVDVEQGNLTIV--EGHSDMITSCNHNHNSQIVTICKDKKA	196
	3	
	RIIEPRKGTVAEKDRPHEGTRPVRAVVEFGKILTTGFSRMSEKQVALW	250
	RIIEPRKGTVAEKDRPHEGTRPVRAVVEFGKILTTGFSRMSEKQVALW	250
	RVFDPRTNSIYNE-VVCHQGVNKRATFAKD-KVITVGFSGKTSERELHIY	244
	4	
	DTKHLLEPLSLQELDTSSGVLLPFPDPDTNIVYLCGKGDSSIRYFEITSE	300
	DTKHLLEPLSLQELDTSSGVLLPFPDPDTNIVYLCGKGDSSIRYFEITSE	300
	DPRAFTPLSAQVDSASGLLMPFYDAQNSILYLAGQGNIRYELVDE	294
	5	
	APFLHYLSMFSKESQRMGMYPKRGLVNNKCEIARFYKLIHRRCEPIAM	350
	APFLHYLSMFSKESQRMGMYPKRGLVNNKCEIARFYKLIHRRCEPIAM	350
	SPYHFLSEPKSATPQRGLCFLPKRCLNTSECTARGLKVTPTVEPISF	344
	TVPRKSDLFGEDLYPPTAGDPALTAEEWLGRODAPLILSLKDGYPVK	400
	TVPRKSDLFGEDLYPPTAGDPALTAEEWLGRODAPLILSLKDGYPVK	400
	RVPRKSDLFGEDLYPPTAGDPALTAEEWLGRODAPLILSLKDGYPVK	393
	SRELVRNGLDTRRRRAPEASGTPSSDAVSRLEEMRNLDATVQELDKR	450
	SRELVRNGLDTRRRRAPEASGTPSSDAVSRLEEMRNLDATVQELDKR	450
	ASAVEFKPVQV---QEGR-NEKELREYEKLRIVATLES---ETVKK	436
	LDRLLEETVQAK	461
	LDRLLEETVQAK	461
	DAKIKE--LTN	445

Fig. 5. Alignment of deduced amino acid sequence of human p57, calf p57 and coronin from *Dictyostelium discoideum*. Upper lanes, middle lanes and lower lanes show the amino acid sequence of human p57, calf p57 and coronin, respectively. The broken lines indicate the lysyl-C peptides (details in section 2) derived from calf p57. Underlines show the WD repeats in p57 and coronin. Amino acids indicated by arrow heads and boxes show the leucine zipper motif in the p57 sequence.

ローニングし、その一次構造を決定した。Fig. 3 のアミノ酸配列に基いて作製した cDNA プローブを用いて、新鮮牛脾臓細胞より調製した cDNA ライブラリーから遺伝子のクローニングを行い、p57 分子の全長をコードした遺伝子を得た。p57 遺伝子の塩基配列を決定し、これに基きアミノ酸配列を推定した。その結果 p57 は 461 残基のア

A.		(A)	(B)
WD-40 repeat	(n1)	LxGHxxxIx α x δ	CDPSGGKxxx α xIWD δ
consensus		F L V	TAA N C LFN VY
B.			
CDC4	(377-409)	376	LRGHMTSVITCLQF.EDNYVITGADDMIRVYDS
CDC4	(418-450)	8	LSGHGSGWALKYA.HGGILVSGSDTRTVRVWDI
CDC4	(459-494)	8	FEHNSVVRCLDIV*NIKIYVTSRSDNTLHVWKL
CDC4	(526-557)	31	LRGHMSVRVTSVSG..HGNIVVSGSYDNTLIVWDL
CDC4	(566-599)	8	LSGHTDRIYSTIYDHERKRCISASMDTIRIWDL
CDC4	(628-659)	28	LQGH TALVGLLRL..SDKFLVSAADSGIRGWDA
T β	(51-84)	50	LRGLAKIYAMHWGDSRLLVASASQDKLIWDS
T β	(112-126)	8	VACGGLDNCSIYNL
T β	(139-171)	8	LACHTGYLSCCRFL.DDNQIVTSRSDNTLHVWKL
T β	(180-213)	8	FTGHTGDMVSLAPDTRLFVSGASASAKIWDL
T β	(222-255)	8	FTGHESDINAICFPNGNAFATGSDATCRFDL
T β	(285-299)	10	LLAGYDFNCNVWDA
T β	(308-340)	8	LAGHDNRVSCLGVTDDGMAVATGSKWDSFLKLN

Fig. 6. Consensus sequence of WD-repeat (A). Examples of WD-repeat (B).

ミノ酸により構成されていることが判明した (Fig. 4)。この遺伝子のホモロジー検索を行ったところ、部分アミノ酸配列の相同性が示されたコロナンと 40.8% の相同性を示した⁴⁾。p57 が哺乳類細胞で共通に存在するアクチン結合蛋白質であるかどうかということと、機能をさらに詳しく調べることに、ヒト p57 の遺伝子のクローニングも行った。ヒト p57 の cDNA は、ヒト前骨髄球性細胞株 HL-60 の cDNA ライブラリーからクローニングした。プローブは、ウシ p57 の cDNA 配列をもとに作製したプライマーを用いて HL-60 由来 cDNA に対して RT-PCR により調製した。ヒト p57 とウシ p57 の相同性は 95% であった (Fig. 5)。従って p57 分子は、哺乳類細胞で高い相同性を持って共通に存在するアクチン結合蛋白質であると推定された。

ウシおよびヒトの p57 の一次構造には、2 つの興味ある分子内構造がみられた (Fig. 5)。1 つは、N 末端側にみられる WD-repeat と呼ばれるくり返し配列で、これが 5 つ存在していた。WD-repeat はコロナンにも存在するが、ヘテロ三量体 GTP 結合蛋白質の β サブユニット等に存在することで興味を集めている。その基本構造は Fig. 6 に示した通りである (T β はヘテロ三量体 GTP 結合蛋白質の一種であるトランスジューシンの β 鎖を意味する) が⁶⁾、他の細胞内情報伝達分子との相互作用に必要な構造と考えられている。たとえ

ば、ホスホリパーゼ C などの分子内に存在するプレクストリンホモロジドメイン⁷⁻¹⁰⁾と相互作用することが知られている¹¹⁾。このような構造を有することは、p57 も細胞内情報伝達に関わる分子であることを推測させる。一方、C 末端側には、ロイシンジッパーと呼ばれるロイシン残基の 7 アミノ酸ごとの繰り返し配列が存在した。ロイシンジッパーは DNA 結合蛋白質^{12, 13)}やマクロファージレクチン¹⁴⁾などに存在し、ロイシンジッパー間の相互作用により、蛋白質分子のホモポリマーあるいはヘテロポリマーを形成する¹⁵⁾。これにより、ロイシンジッパーも WD-repeat 同様、細胞内情報伝達に関与する可能性が考えられた。

4. p57 のアクチン結合活性とアクチン結合部位

p57 はコロニンと 40.8% の相同性を示すが、これらの特性を比較した結果を Table 1 に示した。構成アミノ酸数は p57 が 461、コロニンが 445 であり大差ないが、コロニンにはロイシンジッパーが存在しない。この表にあげたようにコロニンは、アクチン結合活性を有し、粘菌の走化性、細胞分裂時に重要な役割を果たしていることが判明している。p57 にも同様な機能、役割があ

Table 1 Comparison of the properties between p57 and coronin.

	p57	coronin
numbers of amino acid	461	445
homology	40.8%	
WD-repeat	yes	yes
leucine zipper	yes	no
actin binding activity	?	yes

るかどうかを調べるため、まずアクチン結合活性の有無を検討した。ヒト p57 と GST の融合蛋白質 (GST-p57) を作製し、F-アクチンとの共沈殿実験を行うことにより、アクチン結合活性は調べた (Fig. 7)。アフィニティーカラムにより精製した GST-p57 を KCl と CaCl₂ を含む緩衝液中で F 化したアクチンとインキュベートし、100,000×g、1 時間遠心する。遠心により得られた沈殿、上清及び遠心前の GST-p57 とアクチンの混合液を電気泳動し、クマジーブリリアントブルー (CBB) で染色する。コントロールの GST は F-アクチンと共沈しない (Fig. 7; GST の P のレーン) が、GST-p57 は F-アクチンと共沈し、GST-p57 のバンドが観察された (Fig. 7; GST-p57, F-アクチン + の P のレーン)。F-アクチンが存在しないと、GST-p57 は沈殿画分に検出されなかった (Fig.

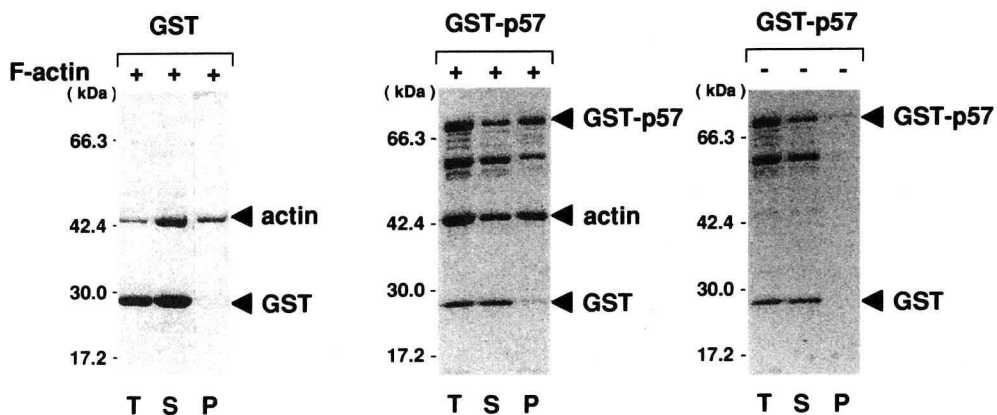


Fig. 7. Co-sedimentation assay of GST-p57 fusion protein with F-actin. T, total reaction mixture; S, ultracentrifuged supernatant; P, ultracentrifuged precipitate (details in section 2). Each protein is indicated with arrow heads.

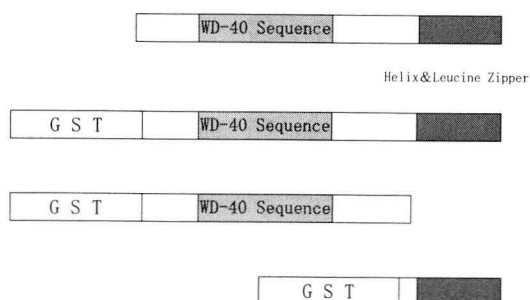


Fig. 8. p57 とグルタチオン-S-トランスフェラーゼの融合蛋白質

7; GST-p57, F-アクチン-の P のレーン). これらの結果より, p57 が F-アクチンと結合することが明らかとなった.

p57 はアクチン結合活性を有するが, その一次構造には, 他のいくつかのアクチン結合蛋白質で

みられるアクチン結合に関わる共通のアミノ酸配列が含まれていない. そこで, p57 のどの部分がアクチン結合に重要なのかを調べることを目的として, p57 の全長を含む GST-p57 以外に, GST と p57 の WD-repeat 部分の融合蛋白質, GST と p57 のロイシンジッパー部分の融合蛋白質を調製して (Fig. 8), アクチンとの結合活性を調べた. Fig. 7 の場合と同様の実験を行った結果 (Fig. 9), WD-repeat を含む構造には, アクチン結合能が存在するが, ロイシンジッパーを含む部分にはアクチン結合能が見られなかった. この結果から, WD-repeat にアクチン結合能が存在すると断定することはできないが, この構造を含む部分にアクチン結合能が存在することは確かである. 粘菌のアクチン結合蛋白質であるコロニン, WD-repeat 構造を有するが, ロイシンジッパーを有さ

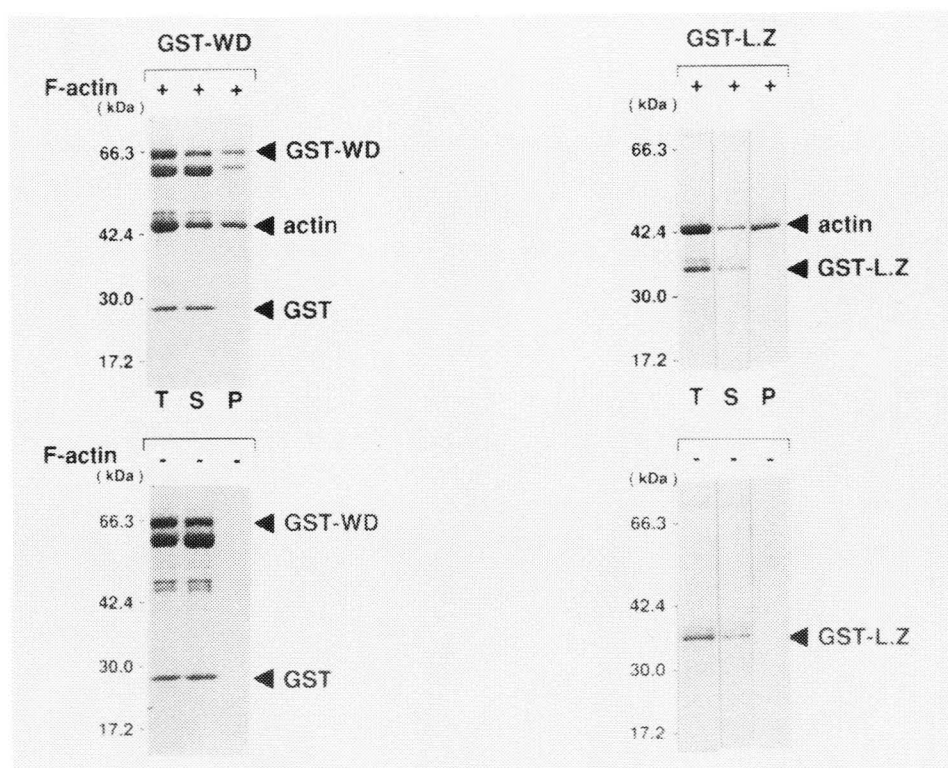


Fig. 9. Co-sedimentation assay of GST-p57 WD-repeat and GST-p57 leucine zipper with F-actin. Details are same as Fig. 7.

ないこともこの推定を支持する。

5. p57 の生体内分布

p57 の機能を考える上で、その生体内分布を調べることが重要であると考え、p57 に対する抗体を作製して、マウスにおける組織分布を調べた。抗体はヒト、マウス（本稿には示していないがマウスの p57 遺伝子もクローニングした）、ウシで共通する p57 の C 末端側の 12 アミノ酸残基のペプチドを合成し、BSA と結合後、ウサギを免疫して作製した（1440 抗体）。

Fig. 10 は、1440 抗体を用いて、マウス p57 の体内分布を調べたものである。Balb/C マウスの各臓器を摘出し、1% SDS で可溶化後、蛋白質量を一定にして、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った。電気泳動後、1440 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより p57 を検出した。p57 は、脳、胸腺、肺、脾臓、骨髓、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節に発現していた。脳以外では、

胸腺、脾臓、骨髓、リンパ節など主として免疫系の組織で発現していた。肺や腸にはマクロファージやリンパ球が混入している可能性が考えられたので、p57 は、脳や免疫系細胞で重要な機能を担っていると推定された。

各種細胞株と血液細胞についても p57 の存在の有無を同様に検討した。血小板と好中球はヒト末梢血を Lymphoprep を用いて遠心、分離することにより得た。マウス T リンパ球はマウス脾臓細胞よりヤギ抗マウス Ig 抗体を用いたパニング法により得た。マウス B リンパ球はマウス脾臓細胞より、抗 Thy-1 抗体と補体処理により分離した。腹腔マクロファージは、マウス腹腔渗出細胞をシャーレに付着させて得た。これらの血液細胞と培養細胞は、1% NP-40 を含む可溶化緩衝液で可溶化後、細胞数を一定にして、SDS-電気泳動、1440 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、p57 の存在の有無を調べられた (Fig. 10)。

p57 は、血液細胞の場合、血小板、好中球、T、

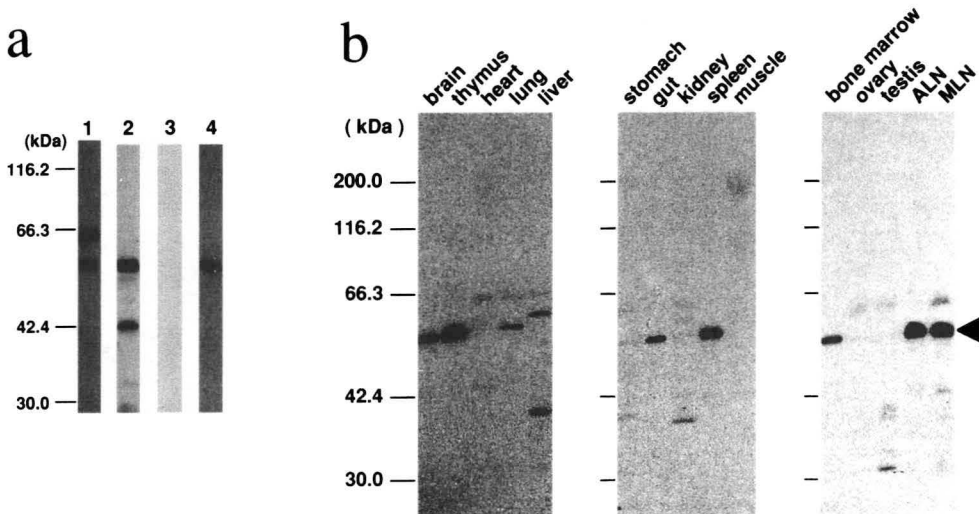


Fig. 10. Immunoblotting analysis of p57 with 1440. The bands of p57 are indicated with the arrow heads at the right side of lanes. In panel (a), lane 1, 2, and 4 show the calf thymus extract, human HL60 cell extract, and mouse thymus extract, respectively. And in lane, 3, 1440 against HL60 cell extract is immuno-absorbed with the 1440 peptide for the immunization. Panel (b) indicates the tissue-distribution of p57 in mouse. Each lane reveals the tissue as shown in the figure. ALN and MLN is axillary lymph node and mesenterium lymph node, respectively.

B リンパ球, マクロファージには存在するが, 赤血球には存在しなかった. 一方, 細胞株では, 単球・マクロファージ系の細胞やリンパ球系の細胞に p57 は存在していたが, COS1 細胞や NIH 3T3 細胞には存在しなかった. 従って細胞レベルでも免疫系の細胞に p57 は局在すると考えられた. このことは, p57 が免疫系細胞の細胞骨格系を介した情報伝達に関与していることを示唆し, 興味深い.

6. 細胞内での p57 とアクチンの挙動の一致

細胞内で p57 が実際にアクチンと結合して機能を発現している可能性を確認するために, 細胞内での p57 とアクチンの分布について, 抗 p57 抗体を用いた免疫組織化学的染色により調べた. これを調べるためにまず, 本来 p57 分子の存在しない NIH 3T3 細胞に p57 の遺伝子を組み込んで発現させた A₁, A₆, B₄ 細胞を得た. A₁ 細胞での p57 の発現は強く, A₆ 細胞での発現は弱かつ

た. B₄ 細胞は増殖性が悪く実験に用いることはできなかった.

Fig. 11 に免疫組織染色の結果を示した. A, D, G はもとの NIH 3T3 細胞, B, E, H は p57 を少量発現した A₆ 細胞, G, F, I は, p57 を多量に発現した A₁ 細胞を示している. 上段は, 抗アクチン抗体を用いてアクチンを染色したものであり, 中段は, p57 を抗 p57 抗体により染色したものである. 下段は, 細胞の核を染色したものである. A₆, A₁ 細胞の染色パターンを見るとわかるように, アクチンと p57 の細胞内分布は一致していた. 従って, p57 は, 細胞内で実際にアクチン結合蛋白質として機能すると考えられた.

7. 結 語

1) 我々は, 粘菌の走化性や細胞分裂に関与していると考えられているアクチン結合蛋白質コロニンと相同性を有する分子量約 57,000 の新規蛋白質 p57 を仔牛胸腺より, 単離・精製すると

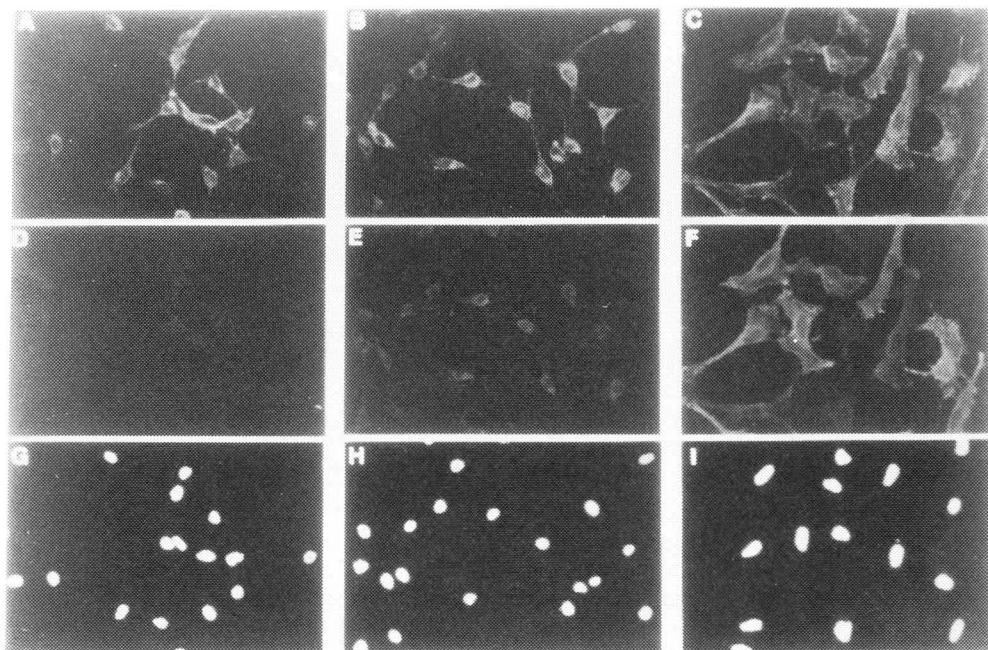


Fig. 11. Intracellular localization of p57 and actin in p57 gene-transfected NIH 3T3 cells. Upper; actin staining, middle; p57 staining, bottom; nuclear staining.

もに、その cDNA クローニングに成功した。ウシ p57 の cDNA は 1575 塩基で構成され、構成アミノ酸残基数 461、推定分子量 50978.46 と計算された。ヒト p57 遺伝子もクローニングし、ウシ p57 と比較したところアミノ酸レベルで 95% の相同性を有していた。

2) p57 は、細胞内情報伝達分子間の相互作用に重要と考えられている 2 種の分子内構造を有していた。5 回の WD-repeat 構造とロイシンジッパー構造であるが、コロニンにはロイシンジッパー構造は存在しなかった。また WD-repeat 構造を含む N 末部分にアクチン結合能の存在することを明らかにした。

3) p57 は、脳と主として免疫系の組織および免疫系細胞に局在していた。

4) p57 は *in vitro* で F-アクチン結合活性を示すとともに、細胞内でもアクチンと挙動が一致することから、細胞内で実際にアクチン結合蛋白質として機能していると推測された。

以上の知見から、p57 は、動物細胞における、脳及び免疫系細胞の細胞骨格系を中心とした細胞内情報伝達に関与する分子であり、走化性や細胞分裂等の重要な機能を担っていることが示唆された。p57 が細胞内でどのような情報伝達経路で機能発現をしているのかを解明していくことが今後の課題である。

8. 謝 辞

本研究に対し大谷賞を賜りましたことを大谷孝吉理事長に厚く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Lawrence, M. B. and Springer, T. A. *J. Immunol.* **151**, 6338-6346 (1993).
- 2) Sheterline, P. and Sparrow, J. (1994) *Protein Profile* **1**, 1-122.
- 3) Suzuki, K., Nishihata, J., Arai, Y., Honma, N., Yamamoto, K., Irimura, T. and Toyoshima, S. (1995) *FEBS Letters* **364**, 283-288.
- 4) De Hostos, E. L., Bradtk, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R. and Gerish, G. (1991) *EMBO J.* **10**, 4097-4104.
- 5) De Hostos, E. L., Rehfuess, C., Bradtk, B., Waddell, D. R., Albercht, R., Murphy, J. and Gerish, G. (1993) *J. Cell Biol.* **120**, 163-173.
- 6) Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R. and Smith, T. F. (1994) *Nature* **371**, 297-300.
- 7) Mayer, B. J., Ren, R., Clark, K. L. and Baltimore, D. (1993) *Cell* **73**, 629-630.
- 8) Haslam, R. J., Koide, H. B. and Hemmings, B. A. (1993) *Nature* **363**, 309-310.
- 9) Shaw, G. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 1145-1151.
- 10) Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J. and Saraste, M. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 343-348.
- 11) Wang, D.-S., Shaw, R., Winkelman, J. C. and Shaw, J. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 29-35.
- 12) Cohen, D. R. and Curran, T. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2063-2069.
- 13) Hurst, H. C. (1994) *Protein Profile* **1**, 125-134.
- 14) Sato, M., Kawakami, K., Osawa, T. and Toyoshima, S. (1992) *J. Biochem.* **111**, 331-336.
- 15) Vinson, C. R., Hai, T. W. and Boyd, S. (1993) *Genes. Dev.* **7**, 1047-1058.